Herpud1 对后肾间充质细胞的作用及其机制的探讨

李依蔓　周钦*

(重庆医科大学检验医学院，重庆 400016)

摘要 为初步探讨 *Herpud1* 在肾脏发育中的生物学作用，过表达 *Herpud1* 载体及敲低 *Herpud1* 载体被构建。载体被转染进后肾间充质细胞，通过 RT-PCR 和蛋白免疫印迹检测了上皮间质的转换过程(EMT)的标志蛋白 E-钙粘蛋白(E-cadherin)，波形蛋白(Vimentin)，Snail 蛋白及内质网应力的标志蛋白葡萄糖调节蛋白 78(GRP78),真核起始因子 2α（eIF2α）的表达变化，通过 EDU 细胞增殖实验检测了 *Herpud1* 对细胞的增殖的作用，同时利用细胞划痕实验验证了细胞的迁移能力。结果显示，与空白对照组相比，在 *Herpud1* 过表达的实验组中，E-cadherin 的表达在 mRNA 和蛋白水平均是降低的，而 Snail 和 Vimentin 的表达则是上升的，并伴随着细胞增殖活性的降低和细胞迁移能力增加，同时内质网应力相关蛋白 GRP78 和 eIF2α 是升高的。在 *Herpud1* 敲低的实验组，E-cadherin 的表达在 mRNA 和蛋白水平均是升高的，而 Snail 和 Vimentin 的表达下降，细胞迁移能力是降低并且细胞增殖活性是升高的，同时内质网应力相关蛋白 GRP78 和 eIF2α 也是降低的。这些结果证明了 *Herpud1* 可以促进 MK3 细胞 EMT 过程，提高细胞的迁移能力，抑制细胞的增殖活性，其机制可能与细胞的内质网应力相关。

关键词：Herpud1；EMT；细胞增殖；内质网应力

The Effects of *Herpud1* on Metanephric Mesenchymal cells and Its Mechanism

LI Yi-man, ZHOU Qin*

(*The School of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China*)

国家自然科学基金(批准号: 8157081224)资助的课题
*通讯作者。 Tel: 023-68485688, E-mail: zhouqin@cqmu.edu.cn
This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 8157081224)
*Corresponding author. Tel: +86-23-68485688, E-mail: zhouqin@cqmu.edu.cn

Abstract To explore biological function of *Herpud1* in kidney development, overexpression and knockdown vector of *Herpud1* gene were transfected into MK3 cells. And then RT-PCR and western blot were used to detect expression of epithelial mesenchymal transition (EMT) marker genes E-cadherin (epithelial cells marker), Vimentin and Snail (mesenchymal cell marker) and endoplasmic reticulum (ER) stress marker genes (GRP78 and eIF2α). And cell proliferation and migration were detected by EDU cell proliferation experiment and wound healing assay. Our results showed in experimental group with *Herpud1* overexpression, E-cadherin was decreased, and expression of Vimentin and Snail was increased at mRNA and protein levels compared with control group. And ER stress markers GRP78 and eIF2α were enhanced at protein levels in MK3 cells with *Herpud1* overexpression. In addition, *Herpud1* promoted cell migration and inhibited cell proliferation. In *Herpud1* knockdown cells, expression of E-cadherin was enhanced at mRNA and protein levels, and expression of Vimentin, Snail, GRP78 and eIF2α is reduced. At the same time, Herpud1 knockdown inhibited cell migration and enhanced ability of cell proliferation. These results demonstrate *Herpud1* can promote EMT of MK3 cells, cell migration and inhibit cell proliferation. The mechanism may be associate with ER stress.

Key words： Herpud1; EMT; cell proliferation; ER stress

肾脏是人类重要的器官之一，它能够排泄人体所产生的废物，维持水电解质的平衡，同时分泌多种激素[1]。在脊椎动物的原肠胚形成期，肾脏是由轴旁中胚层和侧中胚层之间的中段中胚层发育而来的，在空间和时间上具有一定连续性[2-5]。在小鼠的胚胎(E)10.5 天时，肾脏主要包括输尿管芽(UB)和后肾间充质(MM)，后肾间充质促进输尿管不断分芽生长，而包绕在输尿管芽外的后肾间充质细胞则发生间质-上皮转化(MET)过程，这些分化过程也不断诱导肾单元的分化[5, 6]。由此看出，后肾间充质细胞是肾脏发育中的关键的细胞之一，而能够影响后肾间充质细胞的调控元件则是影响肾脏发育的重要因素。

Herpud1 是由同型半胱氨酸诱导的，具有泛素化结构的内质网膜蛋白,它的表达与内质网应力升高有关，参与了内质网相关的降解通路(ERAD)，即促进错误折叠或者未折叠蛋白的降解通路[7, 8]。Herpud1 作为体内重要的蛋白，它在很多组织和细胞中均有表达[9]。目前有研究显示 Herpud1 在人类的胚胎肾细胞 293T 中是有表达的并且把 293T 作为工具细胞研究了 *Herpud1* 的启动子[10]。然而几乎没有文章研究 *Herpud1* 对胚胎肾发育的作用。本文主要研究了 *Herpud1* 对后肾间充质细胞 MK3 的上皮间质转化过程，迁移和增殖过程的影响。由于 Herpud1 蛋白可由内质网应力诱导，这就提示了它的许多功能可能与内质网应力有关，所以我们探究了 Herpud1 是否通过诱导内质网应力影响 MK3 细胞的表型变化的。

1. 材料与方法

1.1 细胞及试剂

MK3 细胞(早期的后肾间充质细胞[11])由美国儿童医学中心的 S. Steven Potter 教授馈赠。高糖培养基(DMEM)和 0.25%的胰酶购买自美国 Gibco，胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购于以色列 Biological Industries (BioInd)公司; TRIzol 总 RNA 提取试剂及脂质体转染试剂(Lipofectamine 2000)来源于 Invitrogen 公司。逆转录试剂盒购于 sigma 公司，RT-PCR 引物合成于生工生物公司(上海)，Ultra SYBR Mixture 试剂购于康为世纪生物公司(江苏)。一抗 Herpud1，E-cadherin，Snail，Vimentin，GRP78，eIF2α，内参β-actin 购自美国 proteintech 公司，辣根过氧化物标记山羊抗兔 IgG 及山羊抗鼠 IgG 抗体购买于生工(上海)生物有限公司。电化学发光试剂(ELC)购于 Millipore 公司。

1.2 细胞培养

MK3 细胞为贴壁细胞，由含有 10%FBS 及 1%的青霉素-链霉素混合溶液的 DMEM 高糖完全培养基培养，并放置于 5%CO_2,37°C 的孵箱中孵育。当汇合度达到 90%的时候，使用 0.25%的胰酶消化细胞并传代后继续培养。

1.3 载体构建

小鼠 *Herpud1* 基因的 CDS 区通过 PCR 方法从 MK3 细胞中扩增出来，连接到载体 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP 中，构建 *Herpud1* 过表达质粒。针对小鼠 *Herpud1* 的 CDS 区的 shRNA 序列被连接到载体 pLKO.1 上，构建敲低质粒。引物如下：*Herpud1*-OV-F: 5’AGACGCCAAGTGTCGTTGTG 3’; R:5’TCAGTTGGC TAGGGCTGGT 3’. *shHerpud1* -F: 5’CCGGCGTTATTCTGAAGAGCTTTA ACTCG AGTTAAAGCTCTTCAGAATAACGTTTTTG 3’; R: 5’AATTCAAAAACGTTATT CTGAAGAGCTTTAACTCGAGTTAAAGCTCTTCAGAATAACG 3’。

1.4 细胞转染

将 MK3 细胞铺板于 12 孔板或者 6 孔板中。当细胞汇合度达到 40%的时候，用脂质体转染试剂 Lipofectamine 2000 转染相关载体 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP-Herpud1 (pCDH-Herpud1)，pLKO.1-shHerpud1，具体步骤根据 Lipofectamine 2000 的说明书进行操作。

1.5 实时荧光定量 RCR（RT-PCR）

转染过表达载体 pCDH-Herpud1 48 小时或者敲低载体 shHerpud1 72 小时后，

收集细胞进行 RNA 提取。取 2ug 的 RNA 产物逆转为 cDNA，稀释 10 倍后，以 4ul cDNA 产物作为模板进行 RT-PCR，检测 EMT 过程的相关标志蛋白的表达。RT-PCR 的程序为：95°C 预变性 10min；95°C 变性 30s，58°C 退火 30s，72°C 延生 30s；40 个循环；最后 65°C 5s，每次升高 0.5°C，直至 95°C。分析软件使用 Bio Rad 软件。引物如下：*Herpud1*-F:5'GTTGGATTGGACCTATTCCG 3'; R:5'CT CTGTCTGAACGGAAACCA 3'. *E-cadherin*-F:5'CAGGTCTCCTC ATGGCTTTGC 3'; R:5'CTTCCGAAAAGAAGGCTGTCC 3'. *Vimentin*-F:5'GGATCAGCTCACCA ACGACA 3'; R 5' AAGGTCAAGACGTGCCAGAG 3'. *Snail*-F: 5' AGCCCAACTA TAGCGAGCTG 3'; R 5' CCAGGAGAGAGTCCCAGATG'3

1.6 蛋白免疫印迹（Western Blot）

收集处理后的细胞之后提取总蛋白，用 BCA 法测定蛋白浓度。取 20ug 蛋白样品加入到 10%的 SDS-PAGE 胶中，100V 跑完胶后，在 300mA，2h 湿转到聚偏二氟乙烯膜(PVD) (millipore 公司)。5%的脱脂牛奶封闭 2h，孵育一抗(均按 1:1000 稀释)，4°C 过夜；洗膜三次，每次 5min。孵育羊抗鼠 IgG 或者羊抗兔 IgG 的抗体(1:5000 稀释)，37°C 孵育 2h，洗膜三次，每次 10min。按照电化学发光试剂的说明在 Bio Rad 化学发光成像系统上进行显影。

1.7 细胞增殖实验

pCDH-Herpud1 载体转染细胞 48h 或者 shHerpud1 载体转染细胞 72h 后，用 PBS 洗三次，按照 EDU 细胞增殖检测试剂盒（锐博公司）的说明进行操作，最后在荧光显微镜（尼康公司）上进行观察并计数。

1.8 划痕实验

待 6 孔板里的处理后的细胞的汇合度达到 80%-90%的时候，利用黄色枪尖进行划痕，PBS 洗 3 次后，换成含 1%的 FBS 的培养基培养，于倒置显微镜下进行拍照，用标记笔在拍照位置进行标记。放进培养箱中继续培养，经过 12 小时后在相同位置再行拍照，用 Image J 统计细胞迁移率，划痕相对迁移率=(0h 划痕宽度-12 小时划痕宽度)÷0h 划痕宽度×100%。

1.9 统计学方法

实验独立重复三次后，试验数据用均数±标准差表示，用 GraphPad Prism 5 进行统计学分析。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ***$P < 0.001$。

2 结果

2.1 *Herpud1* 过表达载体与敲低载体在 MK3 细胞表达效率

pCDH-Herpud1 和 pLKO.1-shHerpud1 的载体转染进 MK3 细胞后，利用 RT-PCR 和 western blot 方法检测了载体的效率。在 *Herpud1* 过表达的实验组中，*Herpud1* 的表达在 mRNA 和蛋白水平是高于对照组的(图 1A, B)。pLKO.1-shHerpud1 载体转染进 MK3 细胞后，*Herpud1* 的表达在 mRNA 水平和蛋白水平是低于对照组的(图 1C, D)。这就提示了 pCDH-Herpud1 和 pLKO.1-shHerpud1 载体能够成功转染进 MK3 细胞中，并且是有效率的，可用于后续的研究。

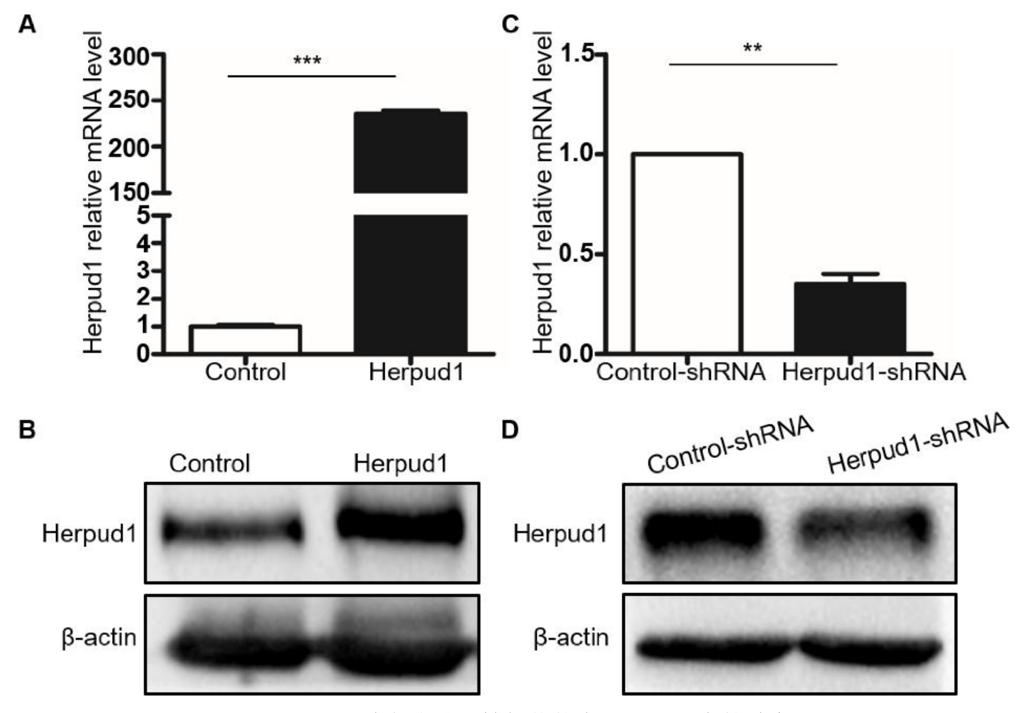


图 1 Herpud1 过表达或者敲低载体在 MK3 细胞中的效率。

Figure 1 Efficiency of vector of Herpud1 overexpression and knockdown in MK3 cells.

A, B: Herpud1 在 mRNA 和蛋白水平的过表达效率。C, D: Herpud1 在 mRNA 和蛋白水平的敲低效率。** $P < 0.001$, *** $P < 0.01$。
A, B: Efficiency of Herpud1 overexpression at mRNA and protein level. C, D: Efficiency of Herpud1 knockdown at mRNA protein level. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

2.2 过表达 *Herpud1* 能够促进 MK3 细胞的上皮间质转化（EMT）过程

在 MK3 细胞中，*Herpud1* 过表达或者敲低之后，利用 RT-PCR 和 western blot 方法检测了细胞 EMT 过程的相关标志蛋白：*E-cadherin*，*Vimentin*，*Snail* 的表达变化。结果显示在 mRNA 水平和蛋白水平上，过表达 *Herpud1* 的实验组的上皮细胞的标志蛋白 E-cadherin 的表达比空白对照组中的表达明显降低了，而间

质细胞标志蛋白Vimentin和Snail的表达量比空白对照组的表达量明显升高了(图2A, B)。这就说明了 *Herpud1* 能够促进 MK3 的 EMT 过程。进一步地，我们证明了在敲低 *Herpud1* 的情况下 EMT 的相关标志蛋白的表达变化。如图 2C, D 所示在 *Herpud1* 敲低的实验组中 *E-cadherin* 在 mRNA 水平和蛋白水平是增高的，而 *Vimentin* 和 *Snail* 的表达量在实验组中是明显降低了。这就说明 *Herpud1* 能够促进 MK3 细胞的 EMT 过程。

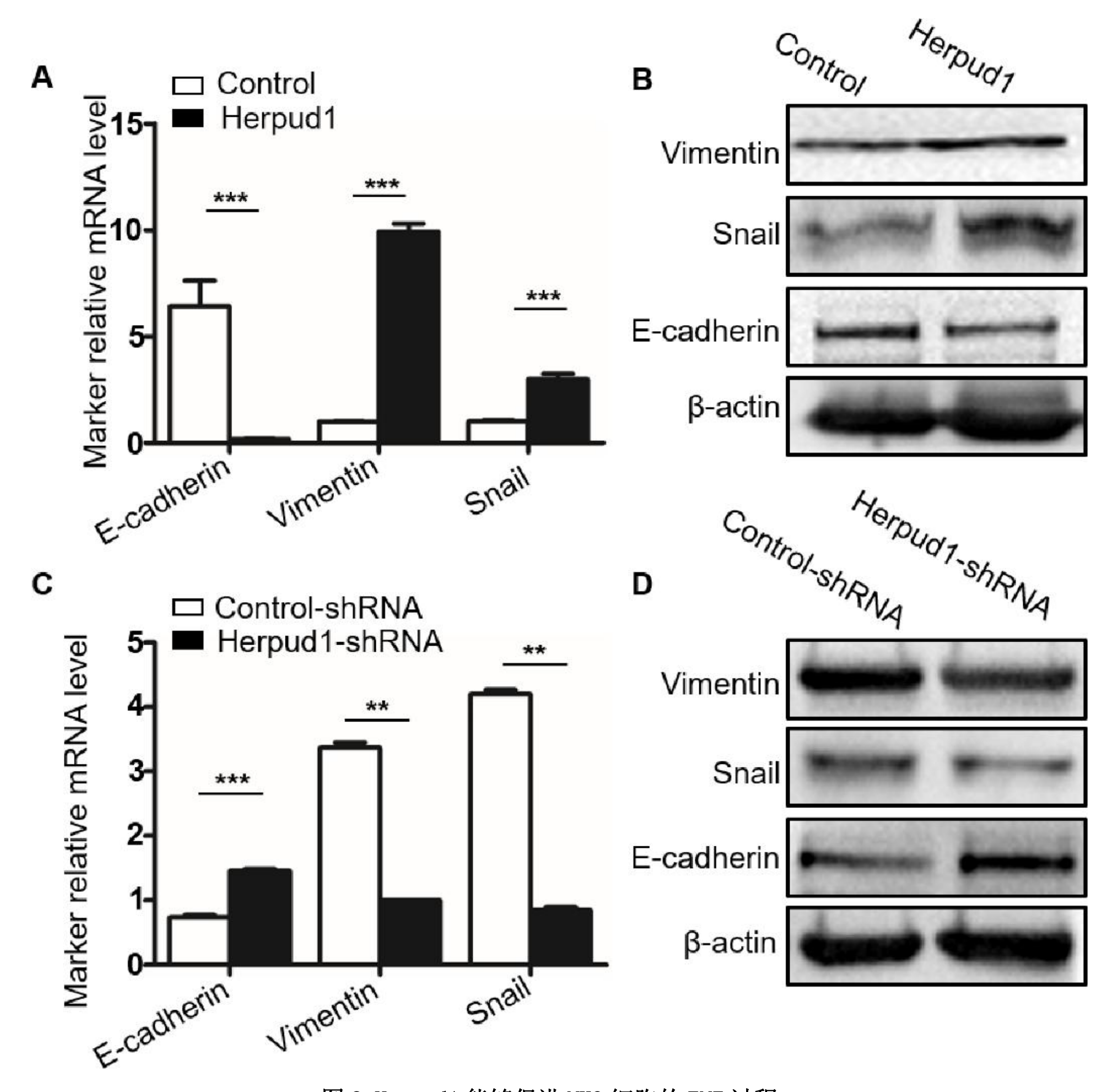


图 2 Herpud1 能够促进 MK3 细胞的 EMT 过程。

Figure 2 Herpud1 promotes MK3 cells EMT process.

A, B: Herpud1 载体在 MK3 细胞中过表达 48h 后，用 RT-PCR 和 Western Blot 检测了 EMT 相关标志蛋白(E-cadherin，Vimentin，Snail)在 mRNA 和蛋白水平的变化；C, D: shHerpud1 载体转染细胞 72h 后，检测了 EMT 相关标志蛋白的 mRNA 和蛋白水平的变化。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$。

A, B: RT-PCR and western blot were utilized to detected expression changes of EMT marker genes E-cadherin, Vimentin and Snail at mRNA and protein levels after Herpud1 vector and control vector was transfected for 48h. C, D: shHerpud1 knockdown vector and control vector were transfected into cells for 72h. Expression of EMT marker genes were detected at mRNA and protein level. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

2.3 上调 *Herpud1* 抑制 MK3 细胞的增殖

有文献报道了 *Herpud1* 能够促进细胞的凋亡，但是 *Herpud1* 对细胞的增殖作用仍是未知的。利用 EDU 细胞增殖试剂盒，我们检测了 *Herpud1* 对 MK3 细胞的增殖的影响。过表达 *Herpud1* 后，实验组细胞增殖的数量明显低于空白对照组的，并且与对照组相比，减少了 54%（$P < 0.05$）（图 3）。敲低 *Herpud1* 后，实验组的细胞增殖数量与对照组相比明显升高（图 3）。由此可知，*Herpud1* 基因的上调能够抑制 MK3 细胞的增殖。

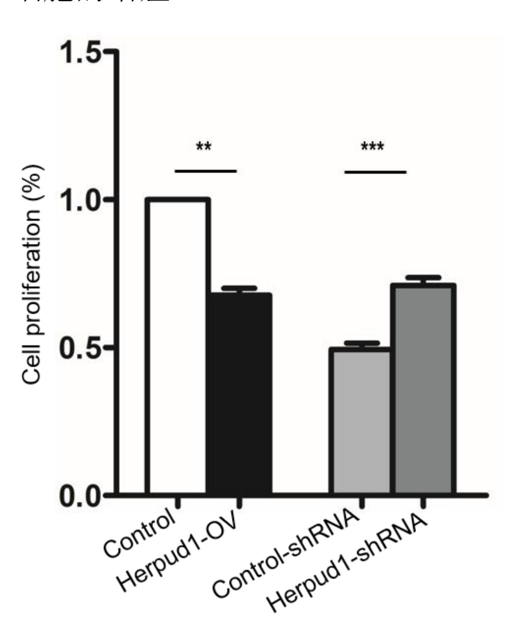


图 3 *Herpud1* 抑制 MK3 细胞的增殖活性

Figure3 *Herpud1* inhibited cell proliferation of MK3 cells

pCDH-Herpud1 载体过表达 48 小时和 shHerpud1 载体转染进细胞 72 小时后，通过 EDU 细胞增殖检测试剂盒检测了 MK3 细胞的增殖活性。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

After pCDH-Herpud1 vectors and shHerpud1 vectors were transfected into MK3 cells for 48h and 72h respectively, we detected MK3 cells proliferation by ERU cell proliferation Kit. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

2.4 *Herpud1* 能够促进 MK3 细胞的迁移

为了验证 *Herpud1* 对细胞迁移的能力，我们进行了细胞划痕实验。结果显示，在细胞划痕 12h 后 *Herpud1* 过表达实验组的细胞迁移率明显高于空白对照组(图 4A)；图 4B 则显示了 *Herpud1* 过表达实验组与空白组的相对迁移比率，说明了 *Herpud1* 过表达促进了细胞的迁移。而在划痕 12h 之后 *Herpud1* 敲低的实验组的细胞迁移率低于空白对照组的迁移率(图 4C)；图 4D 则是根据图 4C 统计的 *Herpud1* 敲低组与空白组的相对迁移比率，发现敲低组的迁移率明显低于空白对照组。这就说明了 *Herpud1* 确实能促进 MK3 细胞的迁移。

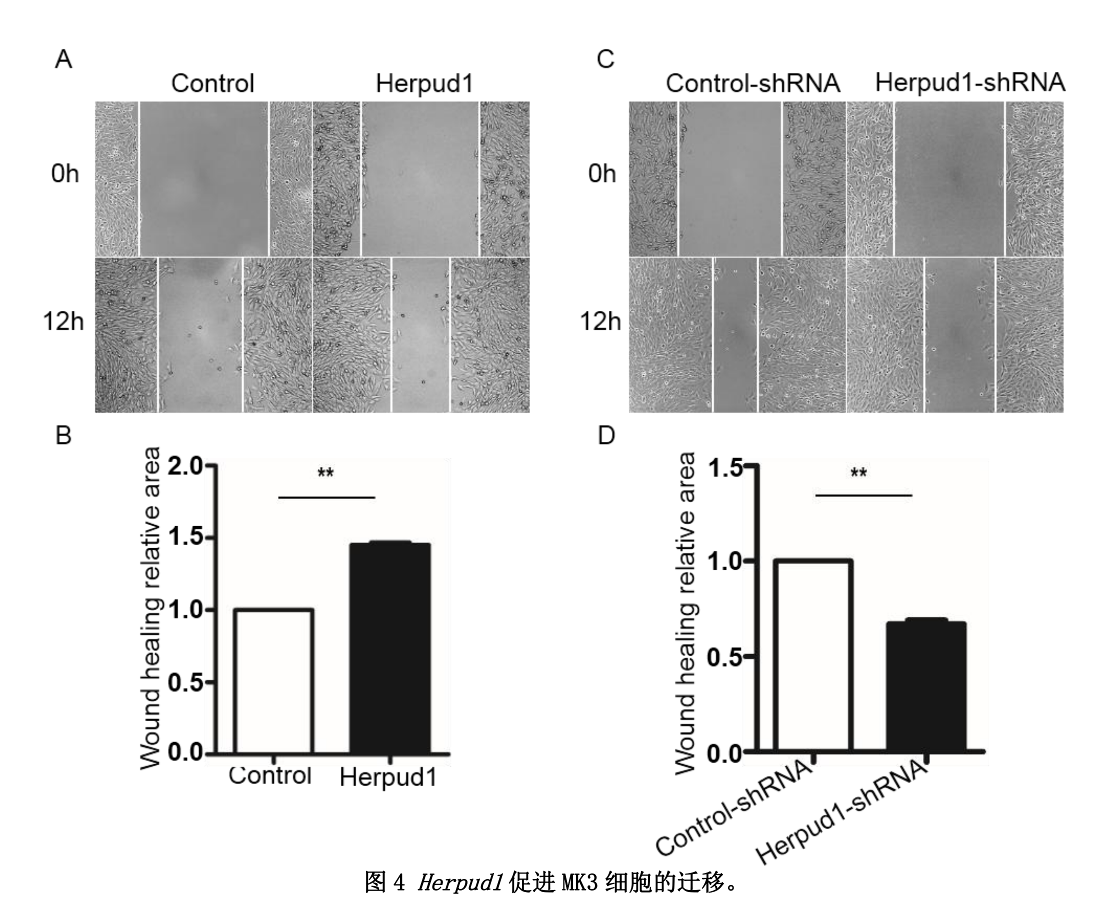


图 4 *Herpud1* 促进 MK3 细胞的迁移。

Figure 4 *Herpud1* promotes MK3 cells migration.

A: 倒置显微镜下观察 *Herpud1* 过表达对 MK3 细胞划痕实验的影响。 B: A 图中细胞的迁移率的统计分析；C: 观察 *Herpud1* 敲低对 MK3 细胞的划痕实验的影响；D：根据 C 图的划痕实验对细胞迁移率的统计和分析。***P* <0.01，与对照组比较。

A: effect of Herpud1 overexpression on wound healing in MK3 cells by inverted microscope. B: Quantitative analysis of cell migration rate according to Figure 4A. C Effect of Herpud1 knockdown on wound healing in MK3 cells. D: Quantitative analysis of cell migration rate according to figure C. ** $P < 0.01$.

2.5 *Herpud1* 过表达能够激活内质网应力

为了探讨 *Herpud1* 促进 MK3 细胞 EMT 过程及细胞增殖的机制，我们通过 western blot 检测了内质网应力的标志蛋白 GRP78 和 eIF2α的表达变化。如图 5A 所示，过表达 *Herpud1* 的实验组与空白对照组相比，内质网应力的相关标志蛋白的表达在蛋白水平上是升高的。图 5B 则是利用 Image J 软件根据图 5A 的蛋白条带进行灰度扫描所得的相对蛋白定量，发现实验组的 GRP78 和 eIF2α分别高于对照组 1.6 倍，1.4 倍。这就说明了 Herpud1 确实能够激活内质网应力。

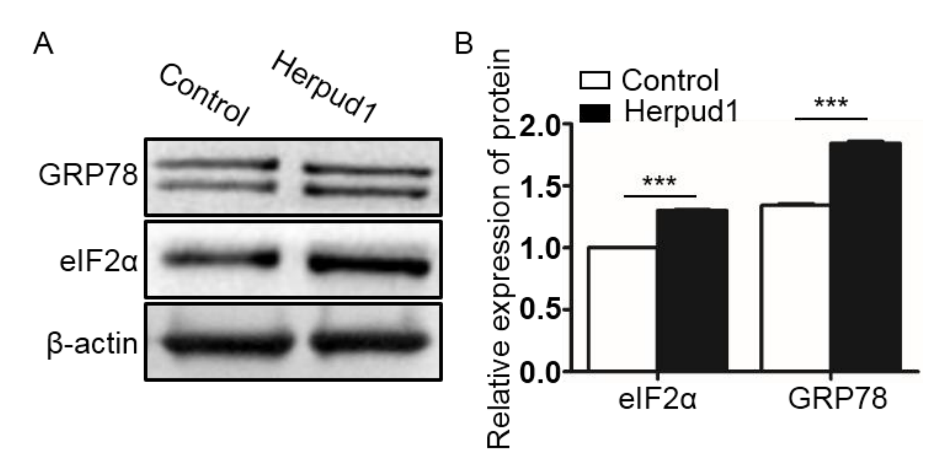


图 5 *Herpud1* 促进内质网应力的相关蛋白表达。

Figure 5 *Herpud1* promotes expression of ER stress-related to protein.

A: *Herpud1* 过表达载体转染 48 h 后，western blot 检测了内质网应力的相关标志物蛋白。B: 利用 Image J 软件扫描图 6A 的蛋白条带灰度。****P* <0.001。

A: Expression of ER stress-related protein was measured by western blot after Herpud1 overexpression vectors was transfected for 48 h. B: Protein brand gray was scanned by Image J software according to figure 6A. ****P* <0.001.

3 讨论

肾脏是人体内的重要器官，研究它的发育过程对肾脏的功能及相关的疾病均有重要意义。早在 1967 年，Starkie wiczowa J 等人就报道了肾脏发育过程中的形态和功能的变化。经过多年的研究，我们对肾脏的发育过程有了更深入的了解，从分子机制的角度深入研究了肾脏的整个发育过程。许多研究已显示 *Pax2/8*, *Six1/2/4* 或者 *Eya1* 等基因均已在后肾间充质细胞中有表达并且影响着肾脏的形成[12]。而我们这篇文章发现了 *Herpud1* 在后肾间充质细胞（MK3 细胞）中的作用。

Herpud1 蛋白是位于内质网膜上，并由内质网应力诱导产生的蛋白质 [13]。已有文献报道 DDK 综合症致死胚胎的原因是内质网的应力相关蛋白 Herpud1 及 ATF4 等蛋白的积累[14]。但是还没有研究证明 Herpud1 蛋白在肾脏发育过程中的作用。我们在 MK3 细胞中证明了 *Herpud1* 的过表达能够促进细胞的 EMT 过程，并且相关标志物蛋白 E-cadherin 的表达是降低的，Snail1 和 Vimentin 的表达是升高的。既然 *Herpud1* 促进了细胞的 EMT 过程，那么 *Herpud1* 对细胞的迁移应该也是有影响的。接着我们通过细胞划痕实验证明了 *Herpud1* 会促进 MK3 细胞的迁移。除此之外，我们还证明了 *Herpud1* 的过表达抑制细胞的增殖，这一结果可以排除增殖对划痕实验的影响。Andreas Kispert 等人的研究显示后肾间充质细胞发生 MET 过程，分化成肾小囊的上皮结构，随后逐渐形成一个单独的肾单位

[15]。这就显示了 MET 过程是肾脏发育中的一个重要的步骤，而从结果看出 *Herpud1* 促进 MK3 细胞的 EMT 过程，这就说明了 *Herpud1* 能够影响肾脏发育的过程。

然而 *Herpud1* 对 MK3 细胞的影响所涉及的机制还不是很清楚。有研究报道 *Herpud1* 能够诱导内质网应力的产生[16]。而内质网应力是 EMT 过程中所必须的一种应力，并且能够诱导 EMT 的过程[17, 18]。因此我们思考 *Herpud1* 是否通过内质网应力来影响 MK3 细胞的 EMT 过程的。我们发现 *Herpud1* 过表达的 MK3 细胞与空白对照组的细胞相比，内质网应力标志蛋白 GRP78 和 eIF2α的蛋白表达水平是升高的。这就说明了 *Herpud1* 在促进细胞 MK3 迁移的过程中内质网的应力升高了，这就证明 Herpud1 可能是通过提高内质网应力从而促进了后肾间充质细胞的 EMT 及迁移过程的。

综上所述，此课题证实了 *Herpud1* 能够促进后肾间充质细胞 MK3 的 EMT 过程及细胞的迁移和凋亡。EMT 过程和细胞迁移及增殖过程的机制可能与 *Herpud1* 所诱导的内质网应力有关，这一机制的具体情况有待我们下一步的探究。本课题阐明了 *Herpud1* 对肾脏发育的重要作用，同时为研究肾脏的发育过程提供了一个新的思路。

参考文献(References)

1 Little MH, McMahon AP. Mammalian kidney development: principles, progress, and projections. Cold Spring Harbor perspectives in biology 2012; 4.

2 Costantini F, Kopan R. Patterning a complex organ: branching morphogenesis and nephron segmentation in kidney development. Developmental cell 2010; 18: 698-712.

3 Dressler GR. Advances in early kidney specification, development and patterning. Development 2009; 136: 3863-74.

4 Faa G, Gerosa C, Fanni D, Monga G, Zaffanello M, Van Eyken P, *et al*. Morphogenesis and molecular mechanisms involved in human kidney development. Journal of cellular physiology 2012; 227: 1257-68.

5 Rumballe B, Georgas K, Wilkinson L, Little M. Molecular anatomy of the kidney: what have we learned from gene expression and functional genomics? Pediatric nephrology 2010; 25: 1005-16.

6 Vainio S, Lin Y. Coordinating early kidney development: lessons from gene targeting. Nature reviews. Genetics 2002; 3: 533-43.

7 Schroder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. Annual review of biochemistry 2005; 74: 739-89.

8 Smith WW, Jiang H, Pei Z, Tanaka Y, Morita H, Sawa A, *et al*. Endoplasmic reticulum stress and mitochondrial cell death pathways mediate A53T mutant alpha-synuclein-induced toxicity. Human molecular genetics 2005; 14: 3801-11.

9 Yamamoto J, Kamata S, Miura A, Nagata T, Kainuma R, Ishii I. Differential adaptive responses to 1- or 2-day fasting in various mouse tissues revealed by quantitative PCR analysis. FEBS open bio 2015; 5: 357-68.

10 Lenz B, Bleich S, Beutler S, Schlierf B, Schwager K, Reulbach U, *et al*. Homocysteine regulates expression of Herp by DNA methylation involving the AARE and CREB binding sites. Experimental cell research 2006; 312: 4049-55.

11 Valerius MT PL, Witte DP, Potter SS. Microarray analysis of novel cell lines representing two stages of metanephric mesenchyme differentiation. Mech Dev 2002; 110 (1-2): 151-64.

12 Davidson AJ. Mouse kidney development. In: StemBook. (Cambridge (MA), 2008).

13 Kokame K, Agarwala KL, Kato H, Miyata T. Herp, a new ubiquitin-like membrane protein induced by endoplasmic reticulum stress. J Biol Chem 2000; 275: 32846-53.

14 Hao L, Vassena R, Wu G, Han Z, Cheng Y, Latham KE, *et al*. The unfolded protein response contributes to preimplantation mouse embryo death in the DDK syndrome. Biol Reprod 2009; 80: 944-53.

15 Kispert A VS, McMahon AP. Wnt-4 is a mesenchymal signal for epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney. Development 1998; 125(21): 4225-34.

16 Hori O, Ichinoda F, Yamaguchi A, Tamatani T, Taniguchi M, Koyama Y, *et al*. Role of Herp in the endoplasmic reticulum stress response. Genes Cells 2004; 9: 457-69.

17 Zhong Q, Zhou B, Ann DK, Minoo P, Liu Y, Banfalvi A, *et al*. Role of endoplasmic reticulum stress in epithelial-mesenchymal transition of alveolar epithelial cells: effects of misfolded surfactant protein. Am J Respir Cell Mol Biol 2011; 45: 498-509.

18 Shah PP DT, Siskind LJ, Beverly LJ. Common cytotoxic chemotherapeutics induce epithelial-mesenchymal transition (EMT) downstream of ER stress. Oncotarget 2017; 8(14): 22625-39.